

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2015/165



ZAKLJUČNO POROČILO RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra projekta	J4-4324
Naslov projekta	Genska elektrotransfekcija mišice - od analize na posameznih celicah do numerične optimizacije parametrov v tkivu
Vodja projekta	19225 Mojca Pavlin
Tip projekta	J Temeljni projekt
Obseg raziskovalnih ur	8427
Cenovni razred	B
Trajanje projekta	07.2011 - 06.2014
Nosilna raziskovalna organizacija	1538 Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko
Raziskovalne organizacije - soizvajalke	104 Kemijski inštitut 381 Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta
Raziskovalno področje po šifrantu ARRS	4 BIOTEHNIKA 4.06 Biotehnologija
Družbeno-ekonomski cilj	07. Zdravje
Raziskovalno področje po šifrantu FOS	3 Medicinske vede 3.04 Medicinska biotehnologija

B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

2. Povzetek raziskovalnega projekta¹

SLO

V zadnjih desetletjih je genska transfekcija z elektroporacijo postala ena najbolj obetavnih metod za nevirusni vnos genskega materiala za gensko terapijo in v zadnjem času tudi za DNA vakcinacijo. Lokalno dovedeni električni pulzi povečajo prepustnost membrane in omogočijo prenos plazmidne DNA (pDNA) ali kratkih RNA v celice. Vendar pa trenutno ne obstaja celovit opis mehanizma vnosa genov na molekularnem nivoju.

Čeprav lahko vnašamo gene v različna tkiva, pa se je skeletna mišica pokazala kot idealno tarčno tkivo za vnos genov, saj je mišično tkivo enostavno dostopno, predstavlja velik delež telesa, ter omogoča dolgotrajno izražanje genov.

Trenutno je ena glavnih ovir za učinkovito uprabo in vivo EGT v kliničnem okolju še vedno relativno nizka učinkovitost zaradi slabe mobilnosti pDNA znotraj medceličnega prostora. Medtem ko imajo študije v celičnih kulturah zelo kontrolirane pogoje, pa mobilnost pDNA ni ovirana ter je zato rezultate in zaključke težko prenesti na nivo tkiva. Nasprotno pa je in vivo okolje slabo nadzorovano ter je zato analizirati mehanizme vnosa z električnimi pulzi. Tako predstavlja razvoj in vitro 3D gelskih modelov tkiva pomemben korak med in vitro ter in vivo študijami.

Prav tako je bilo dosedaj zelo malo študij izvedenih na primarnih mišičnih celicah, čeprav je mišično tkivo znano kot idealno za gensko elektrofekcijo, saj omogoča učinkovito ter dolgotrajno stabilno izražanje genov. Nadaljni pomembni korak za prenos metode za klinično zdravljenje ljudi je "scale up" in vivo raziskav iz malih živali na ljudi. Navkljub velikemu številu in vivo študij na živalih, so parametri vedno določeni šele po obsežnem eksperimentih. Več ključnih člankov na temo in vivo genske elektrotransfekcije je izpostavilo potrebo po bolj sistematični optimizaciji elektroporacijskega protokola, kar je ključen korak do bolj učinkovite elektrogenske terapije, prenos metode na ljudi, ter hitrejši prehod v klinično uporabo. Zato je za uspešno uporabo genske elektrofekcije v biomedicini pomemben korak razvoj naprednih numeričnih modelov za optimizacijo parametrov elektroporacije.

Eden izmed zanimivih problemov je tudi vnos kratkih molekul RNKi z elektrotransfekcijo, saj je bilo pokazano, da imajo kratke RNKi pomembno vlogo v regulaciji izražanja genov in lahko njihova uporaba vodi do novih terapij.

Cilji predlaganega projekta so teoretično in eksperimentalno analizirati mobilnost plazmidne DNA in učinkovitost elektrotransfekcije v 3D kolagenskih modelih z vgrajenimi celicami; analiza in optimizacija genske elektrotransfekcije na primarnih humanih mišičnih celicah; raziskati pomen satelitskih celic za dolgotrajno izražanje vnešene pDNA; analiza in vizualizacija korakov elektrotransfekcije; določitev optimalnih parametrov za vnos siRNA in miRNA v primarne mioblaste; ter razvoj 3D numeričnih modelov skeletne mišice za optimizacijo položaja elektrod in električnih parametrov za bolj učinkovito in vivo gensko elektrofekcijo.

ANG

In the last decades, in vivo gene transfer with electroporation (gene electrotransfer) has emerged as a promising method of delivery for nonviral gene therapies and recently also for DNA vaccines. Locally delivered electric pulses increase membrane permeability and enable transfer of plasmid DNA (pDNA) or short strand RNA into the cells. Specifically, skeletal muscle was found to be an ideal target tissue for electrotransfer since high efficiency of transfer can be obtained, it represents large portion of body mass that is relatively easily accessible, and prolonged expression of genes can be achieved.

Currently, one of major obstacles for efficient use of in vivo electrogene therapy (EGT) in clinics is still relatively low efficiency due to poor mobility of pDNA inside extracellular matrix (ECM). While studies performed on cells in culture have very controlled conditions, the mobility of pDNA is not hindered and the results have limited use when relating to tissue level. In contrast, in vivo environment is poorly controllable and it is difficult to investigate the mechanisms of the electrotransfer. Therefore, development of in vitro 3D gel model of tissue represents an important step between in vitro and in vivo studies. Furthermore, only few studies were done on primary myoblast cells, even though muscle tissue is identified as a tissue of choice for the gene electrotransfer.

Another remaining challenge in final realization of the method for clinical treatment is scaling up the in vivo research to humans. In spite of a large number of in vivo studies on animals the parameters are always determined after extensive experimentation. Several

important papers on in vivo EGT identified a need for more systematic optimization of the electroporation protocol as a crucial step toward more efficient EGT,, and faster translation to clinics. Therefore, important step for successful use of gene electrotransfer for biomedical applications is development of advanced numerical models for optimization of the electroporation parameters.

In last decade also short RNAs were shown to play important part in gene regulation and are interesting for future therapies, thus this is a promising field of research.

The objectives of the proposed project are to theoretically and experimentally analyze mobility of plasmid DNA and electrotransfer efficiency in 3D collagen models with embedded cells; to analyze and optimize experimentally gene electrotransfer on primary human myoblast culture and to analyze role of satellite cells in long-term electrotransfection efficiency; to determine optimal pulsing conditions for delivery of short RNAs in primary human myoblasts; to analyze and visualize different steps of gene electrotransfer experimentally and theoretically; and finally, to develop a 3D numerical model of a skeletal muscle for optimization of electrode positions and applied voltages for more effective in vivo electrotransfer and scale up analysis from small animals to humans.

3. Poročilo o realizaciji predloženega programa dela na raziskovalnem projektu²

Optimizacija vnosa plazmidne DNA v primarne humane mioblaste –primerjava z lipofekcijo

Vnašali smo plazmid pEGFP-N1, elektrotransfekcijo pa smo izvedli na primarnih celicah – humanih mioblastih gojenih in vitro z uporabo osmih zaporednih visokonapetostnih pulzov. Odstotek preživetja mioblastov ter transfekcije smo izboljšali z optimizacijo elektroporacijskega medija ter optimizacijo parametrov električnih pulzov (dolžina pulzov, jakost električnega polja). Ugotovili smo, da je preživetje celic v mediju brez kalcijevih ionov boljše, izbrani medij (RPMI) pa omogočajo zelo visok delež preživetja celic (do 90%) pri tem pa smo ohranili visok delež transfeciranih (40%) celic. Pokazali smo da lahko z optimalnim medijem dosežemo z elektrotransfekcijo primerljivo učinkovitost lipofekciji, pri tem pa je metoda zelo primerna tudi za in vivo transfekcijo. V publikacijo tudi razložimo mehanizem vpliva različnih komponent medija na samo učinkovitost elektrotransfekcije ter prednosti in slabosti vsake od metod

V sodelovanju z dr. Borisom Rogljem smo izvedli tudi prve poskus z elektrotransfecijo primarnih celic hrbtenjače in dosegli zelo učinkovit vnos, kar je zanimivo za biomedicinske aplikacije in odpira nove možnosti sodelovanja.

Analiza utišanja genov z elektroporacijo

Del projekta je usmerjen v razvoj protokolov ter analizo vnosa kratkoverižnih RNA v primarne mišične mioblaste, specifično pa smo se osredotočili na utišanje gena HIF ("hypoksia inducible factor"), ki ima pomembno vlogo pri različnih patologijah, saj igra ključno vlogo pri odzivu celic na hipoksične pogoje in je tudi ena od potencialnih molekularnih tarč za zdravljenje raka.

Izvedeli smo široko analizo možnih naborov električnih pulzov za vnos siRNA za gen HIFalpha ter dosegli učinkovito utišanje pri optimalnih pogojih 80%, vzporedno smo izvedli tudi študijo viabilnosti celic po elektroporaciji za iste parametre. Izdelali pa smo tudi posebno geometrijo elektrod primernih za tovrstne študije.

Osredotočili na razumevanje mehanizmov vnosa, zato smo vzporedno analizirali, tako vnos majhne fluorescenčne molekule PI, utišanje na nivoju mRNA z metodo qPCR, določitev proteinov z metodo Western Blot kot tudi viabilnost. Pri viabilnosti smo analizirali tako potencialno neposredno celično smrt zaradi električnih pulzov kot tudi vpliva na proliferacijo. Nadalje smo tudi teoretično analizirali elektroforetsko silo in energijo pulzov za različne protokole in analizirali korelacijo z vnosom siRNA. Tako protokoli vnosa, kot tudi analiza

mehanizmov vnosa različnih kratkoverižnih RNA (siRNA, mRNA, shRNA...), so zanimivi za terapevtske namene ali in vitro biotehnološke aplikacije. Pokazali smo, da je učinkovita elektropermabilizacija in zadostna elektroforetska sila ključna za uspešen vnos siRNA, vendar premočni električni pulzi oz. predolga dolžina izrazito zmanjša preživetje, kar pomeni, da glede na vrsto aplikacije izbiramo med pulzi ki omogočijo visoko stopnjo utišanja z določeno toksičnostjo ali pa manjše utišanje z boljšim preživetjem.

Analiza mehanizmov elektrotransfekcije - vizualizacija interakcije, sistematična primerjava pulznih protokolov, mehanizem prehajanja DNA čez membrano

Analizirali smo hipotezo, da je elektroendocitoza mehanizem prehajanja DNA v citoplazmo. Objavili smo tudi že publikacijo, kjer analiziramo potencialno vlogo endocitoze pri genski elektrotransfekciji na celicah CHO in vitro, samo študija pa je zanimiva za širše področje elektrotransfekcije in razumevanje mehanizmov vnosa plazmidne DNA. S fluorescenčno mikroskopijo smo lahko vizualizirali endocitozo (uporabili smo membransko barvilo FM1-43FX), izvedli pa smo dva tipa protokolov, da bi ugotovili selektivno povečano endocitozo na pragom za elektrotransfekcijo. Naši rezultati kažejo, da nivo endocitoze podoben za podpražne in nadpražne pulze, zato sklepamo, da ta mehanizem ne prispeva ključno k vnosu DNA ampak gre bolj verjetno za translokacijo čez pore.

Iz biofizikalnega stališča je zanimivo tudi razumeti ali fluidnost membrane ključno vpliva na učinkovitost elektrotransfekcije. Zato smo izdelali protokole za meritev fluidnosti celične membrane. Vzporedno smo primerjali dve celični liniji CHO (ovarijske celice hrčka) in B16F1 (mišji melanom), vendar pa rezultati kažejo da fluidnost membrane ne korelira s sponjo genske transfekcije.

Nadaljevali smo z analizo mehanizmov genske elektrotransfekcije in vizualizacije prehoda DNA. Kot prvi smo sistematično analizirali tri različne tipe pulznih protokolov ki se uporabljajo standardno za in vitro ter in vivo aplikacije na celicah CHO, vnašali smo plazmid pEGFP-N1 za GFP (green fluorescent protein). Poleg vizualizacije procesov interakcije DNA z membrano in transfekcije smo tudi procese ustrezno kvantificirali: % transfekcije, intenziteta interakcije DNA z membrano z barvilom TOTO, ki barva pDNA, % preživetja ter teroretična analiza elektroforeze in akumulacije DNA na membrani. Izračunali smo tudi celoten izplen transfekcije – absolutna transfekcija glede na začetno število celic, kjer smo pokazali, da protokol s krajšimi pulzi omogoča višji izplen preživetih transfeciranih celic v primerjavi z dolgimi pulzi, kar je zelo pomembno za določene biotehnološke razsikave; medtem ko je v in vivo bolj učinkovito uporabili dolge pulze ali HV+LV kombinacijo, saj omogočajo višjo transfekcijo zaradi višje akumulacije DNA na membrani.

Celotno študijo smo razširili z namenom sistematične analize vseh korakov elektrotransfekcije od elektropermabilizacije, interakcije, prehajanja čez celično membrano do končne učinkovitosti transfekcije in preživetja celic. Osredtočili smo se tudi na preverjanje možnega mehanizma prehajanja čez plazemsko membrano (endocitoza ali translokacija).

Študijo smo izvedli vzporedno na pritrjenih celicah in celicah v suspenziji, kar je dalo večji pomen rezultatom, saj se celice v suspenziji dostikra uporabljajo in vitro zaradi tehničnih razlogov med tem ko pritrjene celice predstavljajo bolj relevanten model za razumevanje procesov v in vivo pogojih. Sistematično analizo ter vizualizacijo procesov smo objavili v reviji Scientific Reports (IF=5.1), pokazali pa smo ključne razlike med pritrjenimi celicami in celicami v suspenziji, nadalje da je interakcija DNA z permeabilizirano membrano ključni korak, ter da je translokacija čez hidrofилne pore verjetni mehanizem prehajanja.

Vpliv elektroporacije na aktivacijo imunskega sistema, analiza stresa

S sodelovanjem Laboratorija za biotehnologijo Kemijskega inštituta smo analizirali vpliv elektroporacije na sprožitev imunskega odziva, trenutno pa je to še precej neraziskano področje. Testirali smo različne protokole električnih pulzov ter vpliv medijev na viabilnost in na sam imunski odziv preko aktivacije inflamasa, proteinskega kompleksa prirojenega imunskega sistema, ki je

zadolžen za sprožitev/aktivacijo vnetnih procesov preko aktivacije vnetnih citokinov. Aktivacijo inflammasoma, ki bi jo utegnili sprožiti različni pulzni protokoli smo opazovali na mišjih makrofagih, specifičnost signalne poti, ki vodi v aktivacijo, pa smo določali s pomočjo mišjih makrofagov z onesposobljenimi geni za določene komponente izbranih signalnih poti.

Ugotovili smo aktivacijo imunskega sistema za pulzne protokole tipične za elektrotransfekcijo, ki pa ni bila specifična za aktivacijo inflammasoma. Rezultati pa so pomembni za uporabo elektroporacije in vivo (DAN vakcinacija, elektrotransfekcija, elektrokemoterapija), saj je pomembno razumeti potencialni imunski odziv.

Del raziskovanja v okviru projekta je osredotočen na razvoj 3-D celičnega modela *in vitro* in elektromobilnosti in difuzije pDNA.

saj je to vmesen model med standardnimi in vitro modeli ter in vivo poskusi, učinkovitost genske elektrotransfekcije v tkivu pa je v primerjavi z in vitro pogoji zmanjšana predvsem zaradi manjše mobilnosti DNA v zunajceličnem matriksu ter nizke koncentracije DNA. Na podlagi naših prejšnjih študij smo razširili eksperimentalne rezultate na celicah Cho vgrajenih v kolagenski matriks. Zgradili smo tudi teoretični model difuzije pDNA v kolagenskem gelu in teoretično analizirali vpliv različnih parametrov (koncentracija plazmida, čas inkubacije, ...) na elektromobilnost pDNA v 3D gelu ter na učinkovitost transfekcije. Dobili smo dobro ujemanje z eksperimentalnimi rezultati - model pa nam bo pripomogel k razumevanju eksperimentalnih rezultatov ter optimizaciji protokolov v ex vivo pogojih (eksplanti hrbtenjače, možganske rezine), v pripravi je tudi znanstvena publikacija v SCI reviji.

Izdelali smo nadgrajeni 3D numerični model,

z uporabo metode končnih elementov (Comsol Multiphysics 3.5a) za optimizacijo genske elektrotransfekcije v skeletni mišici, ki omogoča optimizacijo elektroporacijskih parametrov. Model vključuje dinamične spremembe prevodnosti med električnimi pulzi, mišično anizotropijo ter sklopitev elektrostatičnih enačb s termodinamičnimi enačbami za oceno termičnih poškodb.

Na osnovi tega smo vzpostavili sodelovanje z vodilnim centrom za elektrogensko terapijo v Evropi za translacijo elektrogenske terapije v kliniko za zdravljenje raka (Herlev Hospital, Copenhagen). Za njihovo specifično konfiguracijo smo tudi prilagodili naše 3D modele ter izvedli parametrično študijo vpliva kota, zasuka, globine elektrod ter dovedene napetosti na reverzibilno in ireverzibilno porirano tkivo.

Model omogoča vizualizacijo distribucije električnega polja za različne geometrije igelnih elektrod, uporabljene pa so bile vrednosti vrednosti eksperimentalne študije na velikih živalih (prašičih) ter klinične študije na ljudeh, v pripravi je skupna publikacija.

Izdelali in objavili smo prvi večnivojski «multiscale» model elektroporacije tkiva

(sistema celic), ki omogoča analizo elektroporacije v sistemu primerljivem tkivu. Rešitev za vsiljeno transmembransko napetost in permabilizacije na posamezni celici smo sklopili s sistemov več celic. Razviti 3D numerični modelom (metoda končnih elementov, programski paket Comsol Multiphysics) je prvi tovrstni model, ki omogoča časovno prostorsko analizo elektroporacije celic: tako lahko analiziramo efektivne (bulk) lastnosti – kot je efektivna prevodnost, delež permabiliziranih celic in časovna dinamika v odvisnosti od zunanega električnega polja. Z modelom pokažemo, da se sam začetni del elektropermabilizacije, ko se poveča prevodnost celične membrane zgodi zelo hitro (nekaj mikrosekund), zato lahko izvedemo sekvenčno računanje električnega polja in prevodnosti, kjer zadnji koraki sekvence predstavljajo stanje nekaj mikrosekund po začetku aplikacije pulza, tekom pulza pa so potem razmere (tokovi, polja) statične oziroma kvazi-statične. To je pomembno tudi za validacijo našega razvitega modela EGT v mišičnem tkivu za optimizacijo genske elektrotransfekcije.

Analiza vpliva celic izpostavljeni električnim pulzom na sosednje celice

Za gensko elektrotransfekcijo je dobro preživetje celic zelo pomembno, še zlasti za vse aplikacije, kjer imamo na voljo majhno število celic, namenjenih elektrotransfekciji. S serijo poskusov smo ovrednotili vpliv električnih pulzov na celice, ki jim niso bile neposredno izpostavljene. Primerjali

smo pritrjene celice in celice v suspenziji in določili delež preživelih celic. Zanimalo nas je ali elektroporirane celice proizvajajo kakšne signalne molekule, ki vplivajo na preživetje sosednjih celic. Pri poskusih na pritrjenih celicah smo določili preživetje celic, ki so se nahajale zunaj območja električnih pulzov (celice v okolici), zanimivo pa smo ugotovili, da ni bilo negativnega vpliva pri pretežno reverzibilni elektroporaciji (dobro preživetje), medtem ko je pri ireverzibilni poraciji umiranje celic celo pospešilo rast sosednjih celic, predvidoma zaradi sproščanja snovi, jih lahko sosednje celice uporabijo za rast. Rezultati na suspenziji so bili podobni. Naši rezultati pripomorejo k razumevanju odziva celic na izpostavitve stresnim pogojem med elektroporacijo. V pričujoči študiji smo predstavili preliminarne rezultate, potrebne pa bodo nadaljnje raziskave, ki bodo potrdile ali ovrgle naše rezultate.

4. Ocena stopnje realizacije programa dela na raziskovalnem projektu in zastavljenih raziskovalnih ciljev³

Povzetek nekaterih ključnih rezultatov

- Rezultati projekta so bili do sedaj objavljeni v **8 izvirnih znanstvenih člankih, od tega 6 v revijah indeksiranih v SCI** ter enem poglavju v knjigi izdani pri založbi ELSEVIER, trenutno sta v recenziji še dva članka, dva pa sta v pripravi za objavo, 14 objav na mednarodnih konferencah
- publikacija za revijo Scientific Report (**A**''- **izjemni dosežki, Nature Publishing Group, IF = 5.1**), z naslovom "**New insights into the mechanisms of gene electrotransfer - experimental and theoretical analysis.**", avtorja Mojca Pavlin in Maša Kandušer ki je predstavila nove poglede in razumevanje mehanizmov elektrogenske transfekcije od eksperimentalne vizualizacije in kvantifikacije procesov (elektropermeabilizacije, interakcije DNA z membrano ter prehajanja čez membrano, vloge celičnega cikla - analize celic v G0 fazi in v fazi deljenja, izražanja proteina) do teoretičnega opisa mobilnosti DNA in interakcije s celično membrano, ki smo jih pridobili tekom projekta.
- **Pojasnili smo relacijo med ključnimi koraki pomembnimi za učinkovit vnos DNA** (elektropermeabilizacij, interakcija z membrano, prehod čez membranov, izražanje proteina), sistematična analiza vseh stopenj elektrotransfekcije pod istimi pogoji tako na pritrjenih celicah kot celicah v suspenziji omogoča integrirano znanje-povezava z teoretičnimi modeli pa daje še dodatno razumevanje procesov
- **Razvit 3D numerični modelov za optimizacij elektrogenske transfekcije v mišičnem tkivu sklopljen z analizo segrevanja- aplikacija ter povezava z in vivo rezultati ter klinično**, ki je ključna za napovedovanje/optimizacijo učinkovitosti v tkivih za realne geometrije.
- **Razvili smo "multiscale" model**, ki povezuje elektroporacijo na nivoju ene celice z modelom sistema celic - tkiva, to je prvi tovrstni 3D numerični model, ki omogoča izračun učinkovitih lastnosti iz lastnosti posamezne celice ter časovno analizo
- **Razvoj protokolov za učinkovit vnos plazmidne DNA ter utišanje genov (vnos siRNA) kot tudi vnos ostalih kratkoverižnih RNA (microRNA, shRNA)** v primarne mišične mioblaste, ki je odprl možnosti za povezovanje s skupinami iz tujine in doma
- Nadgrajeni rezultati v 3D in vitro kolagenskem modelu tkiva s teoretičnim modelom difuzije in elektromobilnosti pDNA v okolju podobnem ekstracelularnemu matriksu v tkivu

5. Utemeljitev morebitnih sprememb programa raziskovalnega projekta oziroma sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine⁴

Tekom projekta, je osnovna sestava projektne skupine ostala nespremenjena. Vključili smo za 1 leto eno mlajšo raziskovalko, ki je sodelovala pri poskusih vnosa DNA v primarne mišične mioblaste (Maruša Stražišar, univ. dipl. biok.) ter eno mlado raziskovalko (Jasno Lojk, univ. dipl. biol.), ki je sodelovala pri poskusih utišanja genov z elektrotransfekcijo ter podoktorsko raziskovalko Selmo Čorović, ki je sodelovala pri razvoju 3D numeričnih modelov

ter pri sodelovanju delu s skupino prof. Julie Gehl v Harlev Hospital v Kopenhagenu.

6. Najpomembnejši znanstveni rezultati projektne skupine⁵

Znanstveni dosežek														
1.	<table border="1"> <tr> <td>COBISS ID</td> <td>10952788</td> <td>Vir: COBISS.SI</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Naslov</td> <td>SLO</td> <td>Novi pogledi na mehanizme genske elektrotransfekcije – eksperimentalna in teoretična analiza</td> </tr> <tr> <td>ANG</td> <td>New insights into the mechanisms of gene electrotransfer - experimental and theoretical analysis</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Opis</td> <td>SLO</td> <td> <p>Članek se osredotoča na analizo mehanizmov vnosa genov z metodo elektroporacije (gensko elektrotransfekcijo), ki se je v zadnjih letih izkazala za obetavno, od virusov neodvisno metodo vnosa plazmidne DNA; oligonukleotidov in kratkih RNA molekul. Predstavili smo nove eksperimentalne in teoretične rezultate analize različnih korakov v procesu elektrotransfekcije pritrjenih celic in celičnih suspenzij, podkrepjene s teoretično analizo relevantnih biofizikalnih procesov.</p> <p>V in vitro študiji smo se dotaknili odprtih vprašanj tega procesa: kako je elektropermeabilizacija povezana z učinkovitostjo elektrotransfekcije; kakšna je vloga elektroforeze DNA za kontakt in prenos čez membrano; vizualizirali in teoretično analizirali smo interakcije med DNA in membrano ter njihovo vlogo pri učinkovitosti transfekcije ter določili razlike med pritrjenimi in suspendiranimi celicami. Uporabili smo različne kombinacije visokonapetostnih in nizkonapetostnih pulzov. Pokazali smo, da je ključni korak vstavitve DNA v elektropermeabilizirano membrano, ki je pod vplivom elektroforetične sile. Vstavljena DNA se nato počasi prenese v citosol, od koder je le še vstop v jedro omejujoči dejavnik transfekcije. Kvantifikacija in teoretična analiza ključnih parametrov je pokazala, da število molekul DNA, ki interagirajo z elektropermeabilizirano membrano, narašča z naraščajočo koncentracijo DNA ali z dodatnimi elektroforetskimi nizkonapetostnimi pulzi poleg visokonapetostnih. Kljub temu transfekcija doseže zasičenje, kar namiguje da se lahko uspešno prenese le določeno število molekul DNA. Razlike med transfekcijo pritrjenih in suspendiranih celic razložimo z bolj homogeno velikostjo, obliko in gibanjem suspendiranih celic.</p> <p>Na podlagi predstavljenih rezultatov sklepamo, da se DNA najverjetneje prenese preko stabilnih elektropor ali preko elektro-stimulirane endocitoze, ki je odvisna od parametrov pulzov. Razumevanje razmerij med permeabilizacijo, elektroforezo, viabilnostjo in učinkovitostjo transfekcije lahko pomaga pri hitrejši optimizaciji protokolov električnih pulzov za specifične aplikacije.</p> <p>Published in Scientific Reports NPG: A", IF=5.08 http://www.nature.com/scientificreports</p> </td> </tr> <tr> <td></td> <td> <p>Our paper focuses on analysis of mechanisms of gene electrotransfer, which has in last years emerged as the most promising non-viral method for delivery of plasmid DNA, oligonucleotides and short RNA molecules. We present new experimental and theoretical results on different steps involved in gene electrotransfer of plated cells and cells in a suspension combined with theoretical analysis of the underlying biophysical phenomena.</p> <p>In our in vitro study we addressed opened questions of this multistep process: how electropermeabilization is related to electrotransfer efficiency; the role of DNA electrophoresis for contact and transfer across the membrane, visualization and theoretical analysis of DNA-membrane interaction and its relation to final transfection efficiency, and the</p> </td> </tr> </table>	COBISS ID	10952788	Vir: COBISS.SI	Naslov	SLO	Novi pogledi na mehanizme genske elektrotransfekcije – eksperimentalna in teoretična analiza	ANG	New insights into the mechanisms of gene electrotransfer - experimental and theoretical analysis	Opis	SLO	<p>Članek se osredotoča na analizo mehanizmov vnosa genov z metodo elektroporacije (gensko elektrotransfekcijo), ki se je v zadnjih letih izkazala za obetavno, od virusov neodvisno metodo vnosa plazmidne DNA; oligonukleotidov in kratkih RNA molekul. Predstavili smo nove eksperimentalne in teoretične rezultate analize različnih korakov v procesu elektrotransfekcije pritrjenih celic in celičnih suspenzij, podkrepjene s teoretično analizo relevantnih biofizikalnih procesov.</p> <p>V in vitro študiji smo se dotaknili odprtih vprašanj tega procesa: kako je elektropermeabilizacija povezana z učinkovitostjo elektrotransfekcije; kakšna je vloga elektroforeze DNA za kontakt in prenos čez membrano; vizualizirali in teoretično analizirali smo interakcije med DNA in membrano ter njihovo vlogo pri učinkovitosti transfekcije ter določili razlike med pritrjenimi in suspendiranimi celicami. Uporabili smo različne kombinacije visokonapetostnih in nizkonapetostnih pulzov. Pokazali smo, da je ključni korak vstavitve DNA v elektropermeabilizirano membrano, ki je pod vplivom elektroforetične sile. Vstavljena DNA se nato počasi prenese v citosol, od koder je le še vstop v jedro omejujoči dejavnik transfekcije. Kvantifikacija in teoretična analiza ključnih parametrov je pokazala, da število molekul DNA, ki interagirajo z elektropermeabilizirano membrano, narašča z naraščajočo koncentracijo DNA ali z dodatnimi elektroforetskimi nizkonapetostnimi pulzi poleg visokonapetostnih. Kljub temu transfekcija doseže zasičenje, kar namiguje da se lahko uspešno prenese le določeno število molekul DNA. Razlike med transfekcijo pritrjenih in suspendiranih celic razložimo z bolj homogeno velikostjo, obliko in gibanjem suspendiranih celic.</p> <p>Na podlagi predstavljenih rezultatov sklepamo, da se DNA najverjetneje prenese preko stabilnih elektropor ali preko elektro-stimulirane endocitoze, ki je odvisna od parametrov pulzov. Razumevanje razmerij med permeabilizacijo, elektroforezo, viabilnostjo in učinkovitostjo transfekcije lahko pomaga pri hitrejši optimizaciji protokolov električnih pulzov za specifične aplikacije.</p> <p>Published in Scientific Reports NPG: A", IF=5.08 http://www.nature.com/scientificreports</p>		<p>Our paper focuses on analysis of mechanisms of gene electrotransfer, which has in last years emerged as the most promising non-viral method for delivery of plasmid DNA, oligonucleotides and short RNA molecules. We present new experimental and theoretical results on different steps involved in gene electrotransfer of plated cells and cells in a suspension combined with theoretical analysis of the underlying biophysical phenomena.</p> <p>In our in vitro study we addressed opened questions of this multistep process: how electropermeabilization is related to electrotransfer efficiency; the role of DNA electrophoresis for contact and transfer across the membrane, visualization and theoretical analysis of DNA-membrane interaction and its relation to final transfection efficiency, and the</p>
COBISS ID	10952788	Vir: COBISS.SI												
Naslov	SLO	Novi pogledi na mehanizme genske elektrotransfekcije – eksperimentalna in teoretična analiza												
	ANG	New insights into the mechanisms of gene electrotransfer - experimental and theoretical analysis												
Opis	SLO	<p>Članek se osredotoča na analizo mehanizmov vnosa genov z metodo elektroporacije (gensko elektrotransfekcijo), ki se je v zadnjih letih izkazala za obetavno, od virusov neodvisno metodo vnosa plazmidne DNA; oligonukleotidov in kratkih RNA molekul. Predstavili smo nove eksperimentalne in teoretične rezultate analize različnih korakov v procesu elektrotransfekcije pritrjenih celic in celičnih suspenzij, podkrepjene s teoretično analizo relevantnih biofizikalnih procesov.</p> <p>V in vitro študiji smo se dotaknili odprtih vprašanj tega procesa: kako je elektropermeabilizacija povezana z učinkovitostjo elektrotransfekcije; kakšna je vloga elektroforeze DNA za kontakt in prenos čez membrano; vizualizirali in teoretično analizirali smo interakcije med DNA in membrano ter njihovo vlogo pri učinkovitosti transfekcije ter določili razlike med pritrjenimi in suspendiranimi celicami. Uporabili smo različne kombinacije visokonapetostnih in nizkonapetostnih pulzov. Pokazali smo, da je ključni korak vstavitve DNA v elektropermeabilizirano membrano, ki je pod vplivom elektroforetične sile. Vstavljena DNA se nato počasi prenese v citosol, od koder je le še vstop v jedro omejujoči dejavnik transfekcije. Kvantifikacija in teoretična analiza ključnih parametrov je pokazala, da število molekul DNA, ki interagirajo z elektropermeabilizirano membrano, narašča z naraščajočo koncentracijo DNA ali z dodatnimi elektroforetskimi nizkonapetostnimi pulzi poleg visokonapetostnih. Kljub temu transfekcija doseže zasičenje, kar namiguje da se lahko uspešno prenese le določeno število molekul DNA. Razlike med transfekcijo pritrjenih in suspendiranih celic razložimo z bolj homogeno velikostjo, obliko in gibanjem suspendiranih celic.</p> <p>Na podlagi predstavljenih rezultatov sklepamo, da se DNA najverjetneje prenese preko stabilnih elektropor ali preko elektro-stimulirane endocitoze, ki je odvisna od parametrov pulzov. Razumevanje razmerij med permeabilizacijo, elektroforezo, viabilnostjo in učinkovitostjo transfekcije lahko pomaga pri hitrejši optimizaciji protokolov električnih pulzov za specifične aplikacije.</p> <p>Published in Scientific Reports NPG: A", IF=5.08 http://www.nature.com/scientificreports</p>												
		<p>Our paper focuses on analysis of mechanisms of gene electrotransfer, which has in last years emerged as the most promising non-viral method for delivery of plasmid DNA, oligonucleotides and short RNA molecules. We present new experimental and theoretical results on different steps involved in gene electrotransfer of plated cells and cells in a suspension combined with theoretical analysis of the underlying biophysical phenomena.</p> <p>In our in vitro study we addressed opened questions of this multistep process: how electropermeabilization is related to electrotransfer efficiency; the role of DNA electrophoresis for contact and transfer across the membrane, visualization and theoretical analysis of DNA-membrane interaction and its relation to final transfection efficiency, and the</p>												

		<p>differences between plated and suspended cells. Combinations of high-voltage and low-voltage pulses were used. We demonstrate that the crucial step is DNA insertion into the electropermeabilized membrane which is governed by electrophoretic force. The inserted DNA is then slowly transferred into the cytosol, where also nuclear entry is a limiting factor for optimal transfection. The quantification and theoretical analysis of the crucial parameters reveals that number of DNA molecules interacting with the electropermeabilized cell membrane increases with higher DNA concentration or addition of electrophoretic LV pulses to HV, while transfection reach saturation suggesting that there is a maximal number of DNA molecule which can be successfully transferred. We also explain the observed differences between transfection of cell suspensions and plated cells due to more homogeneous size, shape and movement of suspended cells.</p> <p>From the presented results we propose that DNA is most probably translocated through the stable electropores or alternatively through electro-stimulated endocytosis, possibly dependent on pulse parameters. Understanding the relation between permeabilization, electrophoresis, interaction, viability and transfection efficiency can aid to faster optimization of optimal electric protocol for specific application.</p> <p>Objavljeno v reviji Scientific Reports NPG: A", IF=5.08 http://www.nature.com/scientificreports</p>
	Objavljeno v	Nature Publishing Group; Scientific reports; 2015; 5; str. 1-11; Impact Factor: 5.078; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.663; A": 1; A': 1; WoS: RO; Avtorji / Authors: Pavlin Mojca, Kandušer Maša
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek
2.	COBISS ID	9897812 Vir: COBISS.SI
	Naslov	<p><i>SLO</i> Analiza vpliva različnih parametrov na učinkovitost transfekcije, preživetje celic ter interakcijo DNA z membrano</p> <p><i>ANG</i> Effect of different parameters used for in vitro gene electrotransfer on gene expression efficiency, cell viability and visualization of plasmid DNA at the membrane level</p>
	Opis	<p><i>SLO</i> Experimentalno in teoretično smo pokazali pomen interakcije DNA z membrano ter korelacijo z učinkovitostjo genske elektrotransfekcije. Raziskava je bila opravljena v sodelovanju s skupino iz Francije, vodja dr. M.P. Rols, CNRS, Toulouse. Kot prvi smo tudi sistematično primerjali različne protokole električnih pulzov za gensko elektrotransfekcijo: dolge pulze (nekaj ms), kratke pulze (nekaj 100 mikros) in kombinacije visokonapetostnih HV in nizkonapetostnih LV pulzov. Hkrati smo analizirali učinkovitost transfekcije, preživetje in kvantificirali interakcijo z membrano. Pokazali smo, da za aplikacije in vivo in v kliniki je bolj primerno uporabiti nabore dolgih pulzov ali kombinacij HV+LV pulzov, saj tako dosežemo največjo učinkovitost. V primeru, ko pa je viabilnost ključnega pomena je bolj primerno izbrati nabore krajših setov pulzov saj omogočajo boljše preživetje celic.</p> <p><i>ANG</i> We have showed experimentally and theoretically the importance of interaction of DNA with the cell membrane, which was analyzed in collaboration with group of dr. M.P. Rols, CNRS, Toulouse, with TOTO dye for different pulses and magnesium concentrations. Furthermore, we for the first time systematically compared different electric pulses used of EGT: long duration, short duration and combinations of electropermeabilizing short HV and electrophoretic long LV pulses, all pulses were analyzed in terms of transfection efficiency, viability and interaction with the cell membrane. Our results show that for translation of a given gene</p>

		electrotransfer protocol to clinical practice it is advisable to use long-duration millisecond pulsing protocols or combination of HV+LV pulses. On the other hand, for certain biotechnological applications where total yield of transfected cells and/or preserved viability is crucial, short duration protocols could be more optimal.
	Objavljeno v	J. Wiley & Sons; The journal of gene medicine; 2013; Vol. 15, no. 5; str. 169-181; Impact Factor: 1.953; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.947; Avtorji / Authors: Haberl Meglič Saša, Kandušer Maša, Flisar Karel, Hodžič Duša, Bregar Vladimir Boštjan, Miklavčič Damijan, Escoffre Jean-Michel, Rols Marie-Pierre, Pavlin Mojca
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek
3.	COBISS ID	8747092 Vir: COBISS.SI
	Naslov	<i>SLO</i> Vloga električno stimulirane endocitoze pri genski elektrotransfekciji
		<i>ANG</i> The role of electrically stimulated endocytosis in gene electrotransfer
	Opis	<i>SLO</i> Dosedaj še ni popolnoma jasen mehanizem prehoda DNA v citoplazmo pri genski elektrotransfekciji, ena izmed hipotez pa je elektro-stimulirana endocitoza. Razvili smo protokol, ki omogoča vizualizacijo endocitoze po dovajanju električnih pulzov. Pokazali, da lahko opazujemo temperaturne odvisne spremembe endocitoze ter opazujemo proces znotraj celične vesikulacije pri izpostavitvi stresu. Ugotovili smo da ni povečanja endocitoze po izpostavitvi električnim pulzom, ki jih uporabljamo za elektrotransfekcijo. Naši rezultati kažejo, da je pravilna hipoteza o translokaciji DNA čez hidrofилne pore v lipidnem dvosloju, kar je pomembno za nadaljnje študije elektrotransfekcije.
		<i>ANG</i> The mechanisms of DNA entry into cytoplasm during gene electrotransfer are so far not clear. One of hypothesis is electro-stimulated endocytotic uptake. We have developed a protocol which enables us visualization of endocytosis during gene electrotransfer. We have shown that we can observe temperature dependent endocytosis and increased vesiculation after exposure to stress. However, our results do not show increased endocytosis after pulse delivery suggesting that the hypothesis of DNA translocation through hydrophilic pores in the lipid bilayer is more plausible.
	Objavljeno v	Elsevier; Bioelectrochemistry; 2012; Vol. 83, no. 1; str. 38-44; Impact Factor: 3.947; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.084; A': 1; WoS: CQ, CU, DA, HQ; Avtorji / Authors: Pavlin Mojca, Pucihar Gorazd, Kandušer Maša
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek
4.	COBISS ID	9058388 Vir: COBISS.SI
	Naslov	<i>SLO</i> Numerična analiza v sistemu več celic za modeliranje elektroporacije v tkivih
		<i>ANG</i> A numerical analysis of multicellular environment for modeling tissue electroporation
	Opis	<i>SLO</i> Razvili smo prvi "multiscale model" elektroporacije tkiva. Do sedaj so obstajale ali rešitve na »bulk« nivoju tkiva kjer so lastnosti tkiv opisane samo z efektivno prevodnostjo ali pa rešitve za elektroporacijo (formiranje por v membrani) na nivoju posamezne celice, vodja projekta pa je pred tem objavila povezava med eno in več celicami za statični primer. V tem članku smo dinamično rešitev za vsiljeno transmembransko napetost in permabilizacije na posamezni celici preko 3D numeričnega modela sklopili s sistemov več celic, tako da lahko opazujemo efektivne lastnosti – kot je efektivna prevodnost, delež permabiliziranih celic in časovna dinamika na bolj realnem »tkivnem« modelu. Določili smo odvisnost deleža elektroporiranih celic od polja ter pokazali, da je po prehodnem pojavu

		elektroporacija trenuten proces. Model omogoča razširitev na specifično tkivo, saj vsebuje celice realnih oblik in porazdelitev po velikosti.
	ANG	We have developed a first multiscale three-dimensional model of tissue electroporation consisting of random distributed core-shell spheres representing cells with given size distribution. So far different models existed, either describing single cell electroporation or 3D models of "bulk " tissue electroporation, while PI had previously developed a static solution for connection of a single cell electroporation with a multicell model. However no model yet had coupled dynamic single-cell solution with a multicellular environment, which is presented in this paper. We investigated the temporal evolution of the electric conductivity of such cell system during application of an applied electric field. We compute the volume fraction of electroporated cells, showing a hyperbolic tangent dependence of electric field. The collective physical processes causing the transient permeability of the cell membranes can be understood by analogy with the physics of a two-state system with an external field. The model enables incorporation of cells of different shapes, spatial organisation and sizes.
	Objavljeno v	American Institute of Physics; Applied physics letters; 2012; Vol. 100, no. 14; str. 1-4; Impact Factor: 3.794; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.629; A': 1; WoS: UB; Avtorji / Authors: Essone Mezeme Melvin, Pucihar Gorazd, Pavlin Mojca, Brosseau Christian, Miklavčič Damijan
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek
5.	COBISS ID	28284967 Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO Elektrotransfekcija in lipofekcija imata primerljivi učinkovitosti za vnos genov v primarne humane mioblaste in vitro
		ANG Electrotransfection and lipofection show comparable efficiency for In vitro gene delivery of primary human myoblasts
	Opis	SLO <p>Transfekcija primarnih humanih mioblastov omogoča raziskave mehanizmov, ki so pomembni za regeneracijo mišic in gensko terapijo mišičnih bolezni. Za raziskave smo izbrali kulturo primarnih humanih mioblastov, saj se te celice na dani razvojni stopnji še vedno delijo, kar je lahko prednost za gensko terapijo. Genska terapija je močno terapevtsko orodje, katerega aplikativnost pa je omejena z nizko učinkovitostjo tehnik za vnos genov.</p> <p>Primerjali smo dve metodi transfekcije: lipofekcijo in elektroporacijo. Metodi smo optimizirali s sistematičnim prilagajanjem parametrov in analizo učinkovitosti transfekcije in celične viabilnosti. V kulturo mioblastov smo vnašali plazmid pEGFP-N1 bodisi z Lipofektaminom 2000 ali elektroporacijo.</p> <p>Učinkovitost transfekcije in celična viabilnost sta obratno sorazmerni pri obeh metodah. Pri elektroporaciji smo optimizirali parametre pulzov tako, da smo dobili tako maksimalno učinkovitost transfekcije kot tudi maksimalno viabilnost. Naši poskusi so pokazali, da je nabor parametrov, ki to omogočajo, zelo ozek. Prekratki pulzi ($8 \times 200 \mu\text{s}$) niso povzročili prenosa genov, predolgi ($8 \times 10 \text{ ms}$) pa so močno zmanjšali viabilnost celic. Optimizacijo smo tako izvedli s pulznimi protokoli $8 \times 2 \text{ ms}$ in $8 \times 5 \text{ ms}$. Najboljše rezultate smo dobili s protokolom $8 \times 2 \text{ ms}$ 8 kV/cm pulzi (44% transfekcija, 74 % viabilnost). Visoko učinkovitost transfekcije smo dobili tudi v drugih poracijskih medijih (iso-KPB, SMEM, RPMI), nizka transfekcija v DMEM in MEM mediju pa je bila posledica visoke koncentracije kalcija (1,8 mM), ki negativno vpliva na viabilnost in s tem na učinkovitost elektrotransfekcije.</p> <p>Celokupna učinkovitost transfekcije (% živih transfeciranih celic) je bila pri optimalnih protokolih za lipofekcijo (32 %) in elektroporacijo (32,2 %) primerljiva. Obe metodi sta tako primerljivo učinkoviti za vnos genov v</p>

		<p>primarne humane mioblaste, kljub temu pa ima elektroporacija nekatere prednosti pri in vivo aplikacijah na skeletne mišice.</p>
	ANG	<p>Transfection of primary human myoblasts offers the possibility to study mechanisms that are important for muscle regeneration and gene therapy of muscle disease. Cultured human myoblasts were selected because muscle cells still proliferate at this developmental stage, which might have several advantages in gene therapy. Gene therapy is one of the most sought-after tools, however its application is limited also due to low efficiency of gene-transfer techniques.</p> <p>Therefore two non-viral transfection methods: lipofection and gene electrotransfer were compared. The parameters that can influence transfection efficiency and cell viability were systematically approached and compared. Cultured myoblasts were transfected with the pEGFP-N1 plasmid either using Lipofectamine 2000 or with electrotransfection.</p> <p>Transfection efficiency and cell viability were inversely proportional for both approaches.</p> <p>The importance of optimisation of electric pulse parameters for gene electrotransfer to achieve both maximal transfection efficiency and maximal cell viability was shown in the experiments, where we obtained that only narrow window of possible electric parameters lead to high transfection yield. Too short pulses ($8 \times 200 \mu\text{s}$) gave almost no transfection, while too long pulses ($8 \times 10 \text{ ms}$) drastically reduced cell viability. Optimisation was therefore performed for the $8 \times 2 \text{ ms}$ and $8 \times 5 \text{ ms}$ pulsing protocols, and the best results were obtained using $8 \times 2 \text{ ms}$ with 0.8 kV/cm pulses (44 % transfection, with 74 % viability). High transfection efficiencies were obtained also in several other media (iso-KPB, SMEM, RPMI), while low transfection in DMEM and MEM was attributed to the relatively high calcium concentration (1.8 mM) which reduces viability and consequently electrotransfection.</p> <p>The total yield of transfected cells (% of transfected viable cells) for the optimal lipofection and optimal electrotransfection protocols were similar (32% vs. 32.5%, respectively). Both of these methods are therefore effective for transfection of primary human myoblasts; however, electroporation might be advantageous for in-vivo application to skeletal muscle.</p>
Objavljeno v		Springer; The journal of membrane biology; 2014; December; Impact Factor: 2.174; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.903; WoS: CQ, DR, UM; Avtorji / Authors: Marš Tomaž, Stražišar Maruša, Miš Katarina, Kotnik Nejc, Pegan Katarina, Lojk Jasna, Grubič Zoran, Pavlin Mojca
Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek

7. Najpomembnejši družbeno-ekonomski rezultati projektne skupine⁶

	Družbeno-ekonomski dosežek	
1.	COBISS ID	35337989 Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO Vodenje projektov, ustanovitev nove raziskovalne skupine
		ANG Coordination of the project group, establishing of young research group
		M. Pavlin že vrsto let dela na področju razvoja biomedicinskih aplikacij ter raziskuje različne pojave povezane z vnosom molekul v celice z električnim poljem ali nanodelci. Dela so bila citirana več kot 600x (400 čistih citatov) na različnih področjih od biofizike do medicine. Vključena je bila tudi v razvoj naprave Cliniporator v sodelovanju s tujimi partnerji (5.FP projekt), ki omogoča izvajanje elektrogenske transfekcije in elektrokemoterapije v

	Opis	<p>SLO</p> <p>kliničnem okolju (predvsem za terapijo raka). V okviru tega je bil podeljen tudi mednarodni patent. Znanstvena dela so nadpovprečno citirana na več področjih, sodelovala pa je pri implementaciji in razvoju več metod in neposredno vodila razvoj protokolov od elektrogenske transfekcije, razvoja 3D in vitro modelov celic vključenih v kolagenske gele (Haberl and Pavlin, J.Memb.Biol 2010) , razvoja protokolov za utišanje genov in vitro do protokolov za analizo internalizacije nanodelcev in citotoksičnosti. Leta 2007 je prejela Luigi Glavani nagrado za mlade znanstvenike društva International Bioelectrochemistry Society.</p> <p>Leta 2010 je ustanovila mlado raziskovalno Skupino za nano in biotehnoške aplikacije kjer uspešno vodi in koordinira interdisciplinarne projekte na področju biomedicine Skupina poleg interdisciplinarne skupine raziskovalcev (fiziki, biologi, biokemiki) vključuje tudi dodiplomske in podiplomske študente, ki imajo možnost dela z najnovejšimi metodami in tehnologijami iz področja biotehnologije in biomedicine.</p> <p>Izkušnje vodje projekta in sodelujočih skupin na interdisciplinarnem področju biomedicine omogočajo razvoj in prenos novih tehnologij v klinično testiranje. Obstoječa sodelovanja omogočajo tudi tesno sodelovanje z kliniki.</p> <p>Skupina in doktorska študentka Jasna Lojk (mentorica M. Pavlin) je v zadnjem letu prejela že dve nagradi na mednarodnih konferencah: 7th Conference on Experimental and Translational Oncology (CETO 2013) in 9th International Conference on Nanosciences & Nanotechnologies (NN12), 3-6 July 2012 za najboljša posterja na področju nanotoksikologije in nanobiomedicine.</p> <p>Povezana doktorska in diplomska dela</p> <p>HABERL MEGLIČ, Saša. Analiza vpliva različnih parametrov na učinkovitost genske elektrotransfekcije v celičnih kulturah in v in vitro modelu tkiva = Analysis of the influence of various parameters on gene electrotransfer efficiency in cell cultures and in in vitro tissue model : doktorska disertacija. Ljubljana: [S. Haberl], 2011. X, 174 str., ilustr. [COBISS.SI-ID 2987633]</p> <p>STRAŽIŠAR, Maruša. Analiza interakcije DNA s celično membrano ter učinkovitost vnosa DNA v celice CHO z elektrotransfekcijo pri nizkih koncentracijah plamida : diplomsko delo. Ljubljana: [M. Stražišar], 2011. IX, 69 f., ilustr. [COBISS.SI-ID 35337989]</p> <p>KOTNIK, Nejc. Primerjava lipofekcije in elektroporacije pri vnosu plazmida pEGFP-N1 v človeške mioblaste in vitro = Comparison of lipofection and electroporation for transfer of plasmid pEGFP-N1 into human myoblasts in vitro : diplomska naloga. Ljubljana: [N. Kotnik], 2011. VIII, 45 f., ilustr. [COBISS.SI-ID 2947953] mentor: prof.dr. Zoran Grubič</p> <p>Research M. Pavlin involves development of new methods and applications in field of biomedicine and biotechnology, specifically delivery by nanoparticle vectors or by electric pulses. She was or is PI of several interdisciplinary research projects. Her papers were cited over 600 times (over 400 pure citations). She was also participating in 5.FP project where Cliniporator device (in collaboration with different European partners) was developed and also resulted in an international patent.</p> <p>Her papers are cited in several research areas. She was directly involved and lead implementation and development of several in vitro protocols of EGT in vitro, from development of 3D in vitro models of cells embedded in collagen gels (Haberl and Pavlin, J.Memb.Biol 2010) to protocols of gene silencing and in vitro and protocols for analysis of nanoparticles internalisation and cytotoxicity.</p> <p>In 2007 she received Luigi Glavani prize of International</p>
--	------	---

		<p>Bioelectrochemistry Society for young investigators. In 2010 she established interdisciplinary young research group that includes researchers with diverse background (physicists, biologists and electrical engineers) as well as undergraduate and graduate students. This gives the students a chance to participate in active research and use state-of-the-art methods of biotechnology and biomedicine. Exiting network of collaborating groups ensures also close contact with clinicians from different fields. Young researcher Jasna Lojk (PhD mentor M. Pavlin) and the group received in last year two best poster awards in international conferences 7th Conference on Experimental and Translational Oncology - CETO 2013 and 9th International Conference on Nanosciences & Nanotechnologies (NN12) based on research and development of new nanoparticles for biomedical applications.</p> <p>Related PhD and diploma thesis HABERL MEGLIČ, Saša. Analiza vpliva različnih parametrov na učinkovitost genske elektrotransfekcije v celičnih kulturah in v in vitro modelu tkiva = Analysis of the influence of various parameters on gene electrotransfer efficiency in cell cultures and in in vitro tissue model : doktorska disertacija. Ljubljana: [S. Haberl], 2011. X, 174 str., ilustr. [COBISS.SI-ID 2987633]</p> <p>STRAŽIŠAR, Maruša. Analiza interakcije DNA s celično membrano ter učinkovitost vnosa DNA v celice CHO z elektrotransfekcijo pri nizkih koncentracijah plamida : diplomsko delo. Ljubljana: [M. Stražišar], 2011. IX, 69 f., ilustr. [COBISS.SI-ID 35337989]</p> <p>KOTNIK, Nejc. Primerjava lipofekcije in elektroporacije pri vnosu plazmida pEGFP-N1 v človeške mioblaste in vitro = Comparison of lipofection and electroporation for transfer of plasmid pEGFP-N1 into human myoblasts in vitro : diplomsko naloga. Ljubljana: [N. Kotnik], 2011. VIII, 45 f., ilustr. [COBISS.SI-ID 2947953] mentor: prof.dr. Zoran Grubič</p>
	Šifra	D.08 Upravljanje in razvoj raziskovalnega dela
	Objavljeno v	[M. Stražišar]; 2011; IX, 69 f.; Avtorji / Authors: Stražišar Maruša
	Tipologija	2.11 Diplomsko delo
2.	COBISS ID	10953300 Vir: COBISS.SI
	Naslov	<p><i>SLO</i> Razvoj realističnega 3D numeričnega modela za napoved učinkovite in varne genske elektrotransfekcije v tkivih</p> <p><i>ANG</i> Developement of a realistic 3D numerical model for prediction of efficient and safe clinical gene electrotransfer</p>
		<p>Kot prvi smo razvili 3D numerični model za optimizacijo genske elektrotransfekcije in vivo. To je prva študija kjer je izvedena optimizacija električnih parametrov in pozicije elektrod za elektrotransfekcijo skeletne mišice. Predstavljena metoda je generična in jo lahko prenesemo na druga tkiva. Predstavljeni rezultati optimizacije so uporabni kot vodilo pri izbiri optimalnih parametrov in konfiguracije elektrod za uporabo metode elektrotransfekcije v kliničnih aplikacijah genske terapije in DNA vakcinacije.</p> <p>Na osnovi tega dela smo vzpostavili sodelovanje z vodilnim centrom za elektrogensko terapijo v Evropi za translacijo elektrogenske terapije v kliniko za zdravljenje raka (Herlev Hospital, Copenhagen, vodja. prof. Julie Gehl). Za njihovo specifično konfiguracijo smo tekom našega obiska te</p>

Opis	SLO	<p>skupine tudi prilagodili naše 3D modele ter izvedli parametrično študijo vpliva kota, zasuka, globine elektrod ter dovedene napetosti na reverzibilno in ireverzibilno porirano tkivo.</p> <p>Model omogoča vizualizacijo distribucije električnega polja za različne geometrije igelnih elektrod, uporabljene pa so bile vrednosti vrednosti eksperimentalne študije na mišici velikih živalih (prašičih) ter klinične študije na ljudeh, v pripravi je skupna publikacija.</p> <p>Povezana publikacija: ČOROVIČ, Selma, ŽUPANIČ, Anže, MIKLAVČIČ, Damijan, PAVLIN, Mojca. Numerical optimization of electric field and electrode configuration for gene electrotransfer into muscle tissue. V: SERŠA, Gregor (ur.), KOS, Janko (ur.), LAH TURNŠEK, Tamara (ur.), ČEMAŽAR, Maja (ur.), FILIPIČ, Metka (ur.), KRANJC, Simona (ur.), MARKELC, Boštjan (ur.). 7th Conference on Experimental and Translational Oncology, Portorož, Slovenia, April, 20-24, 2013. Book of abstracts. Ljubljana: Association of Radiology and Oncology, 2013, str. 114. [COBISS.SI-ID 9805396]</p>	
	ANG	<p>ANG We have developed (PI lead the research team) a first 3D numerical model for optimization of gene electrotransfer in vivo. It is the first study that presents optimization of electric parameters and electrode positions for gene electrotransfer in skeletal muscle. Furthermore, our numerical model is generic and can be applied to other tissues. The results can be used as a guideline for researchers in selecting optimal parameters for in vivo studies of electro-gene therapy and electro-DNA vaccination and could advance translation into clinical environment.</p> <p>Based on this we had established a collaboration with the leading research medical center (Herlev Hospital, Copenhagen, head prof. Julie Gehl) in Europe for translation and application of electrogene transfer for cancer therapy. During our stay in this group we have adapted our models for their specific configuration and performed parametric analysis of electrodes positions, depth of insertion and applied voltages, the parameters were based on animal pig study and clinical study of gene electrotransfer in muscle tissue of this group.</p> <p>Related publication: ČOROVIČ, Selma, ŽUPANIČ, Anže, MIKLAVČIČ, Damijan, PAVLIN, Mojca. Numerical optimization of electric field and electrode configuration for gene electrotransfer into muscle tissue. V: SERŠA, Gregor (ur.), KOS, Janko (ur.), LAH TURNŠEK, Tamara (ur.), ČEMAŽAR, Maja (ur.), FILIPIČ, Metka (ur.), KRANJC, Simona (ur.), MARKELC, Boštjan (ur.). 7th Conference on Experimental and Translational Oncology, Portorož, Slovenia, April, 20-24, 2013. Book of abstracts. Ljubljana: Association of Radiology and Oncology, 2013, str. 114. [COBISS.SI-ID 9805396]</p>	
Šifra	F.01 Pridobitev novih praktičnih znanj, informacij in veščin		
Objavljeno v	COST; STSM reports homepage; 2014; Avtorji / Authors: Čorović Selma		
Tipologija	1.25 Drugi sestavni deli		
3.	COBISS ID	9892180	Vir: COBISS.SI
Naslov	SLO	Optimizacija protokola elektroporacije za vnos kratkoverižne RNA v primarne humane mioblaste- utišanje HIF alpha	
	ANG	Optimization of electroporation conditions for siRNA delivery into cultured primary human myoblasts	
		V sodelovanju z Inštitutom za patofiziologijo (Medicinska fakulteta UL) smo razvili protokole za vnos kratkoverižnih RNA in analizirali mehanizme	

Opis	SLO	<p>njihovega vnosa v primarne mišične mioblaste – specifično smo se osredotočili na utišanje gena za HIF ("hypoksia inducible factor"), ki je ključni regulator celične homeostaze pri hipoksiji ter ima pomembno vlogo pri različnih patologijah. Optimizirali smo elektroporacijski medij in določili parametre električnih pulzov, s katerimi smo dosegli 80% utišanje mRNA za HIF-1α. Vzporedno smo izvedli tudi študijo viabilnosti celic po elektroporaciji za iste parametre.</p> <p>Utišanje smo spremljali z metodama qPCR in Western blot, kjer smo opazovali učinek na tarčno mRNA ter na sam protein HIF-1α. Zaradi pomena samega HIF-1α za različne mišične patologije smo preverili tudi učinek na "down-stream" gene za PGK (phosphoglycerate kinase) in VEGF (vascular endothelial growth factor). Pripravljamo prvo objavo v mednarodno revijo. Sam protokol vnosa, ki smo ga razvili pa nam bo omogočal vnos različnih kratkoverižnih RNA (siRNA, mRNA, shRNA...), kar je zanimivo tako za raziskave mehanizmov vnosa genskega materiala v celice kot tudi za terapevtske namene. HIF, VEGF (vključen v angiogenezo) in PGK so tudi ključni za celični metabolizem ter tako predstavljajo potencialno tarčo pri zdravljenju raka.</p> <p>Delo na primarnih humanih mioblastih poteka v sodelovanju z Laboratorijem za molekularno nevrobiologijo Inštituta za patofiziologijo (vodja prof. Zoran Grubič), končni cilj pa je uporabiti elektrotransfekcijo kot metodo vnosa ali utišanja terapevtskih genov z namenom zdravljenja določenega bolezenskega stanja.</p> <p>Na podlagi predstavljenih rezultatov smo bili povabljeni v konzorcij za projektno prijavo BIOENCA v okviru COST programov, za sodelovanje na področju matičnih celic ter regenerativne medicine.</p>
	ANG	<p>In collaboration with the Institute for pathophysiology (Faculty of medicine, University of Ljubljana) we developed the electroporation protocol and analyzed the mechanisms of introduction of short RNAs into cultured primary human myoblast cells. The protocols were optimized using siRNA against HIF-1α (Hypoxia Inducible factor 1α) mRNA. HIF is a transcription factor and key regulator of cellular oxygen homeostasis and has an important role in several pathologies. We optimized the electroporation medium and the parameters of electric pulses, which enabled us to achieve 80% silencing of HIF-1α mRNA. In parallel, we performed viability studies for the same electroporation conditions.</p> <p>Suppression of HIF-1α expression was first estimated by measuring HIF-1α mRNA with qPCR. Depletion of HIF-1α protein was subsequently confirmed with Western Blot. Due to involvement of HIF-1α in several muscle pathologies, the effect of HIF-1α silencing was confirmed also on two HIF-1α's downstream gene targets; PGK (phosphoglycerate kinase) and VEGF (vascular endothelial growth factor). Manuscript of this research for the publication in an international journal is in preparation. The developed protocol will not only serve as a mean to study the mechanisms of introduction of gene material, but also for therapeutic purposes.</p> <p>HIF, PDK and VEGF (involved in angiogenesis) are involved in cellular metabolism and were identified as targets for cancer treatment. The research on primary human myoblast cells is performed in collaboration with the Laboratory for molecular neurobiology with the purpose of using electroporation as a method for introduction or silencing of therapeutic genes as a mean to treat specific disorders.</p> <p>Based on this work we were also invited to join the network of groups preparing COST proposal BIONECA.</p>
Šifra	F.18	Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom

		(seminarji, forumi, konference)	
	Objavljeno v	Croatian Institute for Brain Research; Abstract book; 2013; Str. 40; Avtorji / Authors: Lojk Jasna, Miš Katarina, Pirkmajer Sergej, Grubič Zoran, Marš Tomaž, Pavlin Mojca	
	Tipologija	1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci	
4.	COBISS ID	9632596	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Genska elektrotransfekcija: od razumevanja mehanizmov do optimizacije parametrov v tkivih
		ANG	Gene electrotransfer : from understanding of the mechanisms to optimization of parameters in tissues
	Opis	SLO	Vodja projekta je na osnovi pridobljenih znanj in metod tekom vodenja projekta "Mehanizmi vnosa DNA pri elektrogenski transpekciji" in tega projekta povezala poznavanje mehanizmov elektrotransfekcije s teoretično razlago mobilnosti DNA. Nadalje oba projekta povezujeta eksperimentalno delo in vitro na standardnih celičnih kulturah, s poskusi na ex vivo eksplantih, 3D gelih ter z 3D numeričnimi modeli mišičnega tkiva. Interdisciplinarni pristop in serija razvitih metodoloških pristopov je omogočilo nova znanstvena spoznanja kot tudi praktične metode, ki jih lahko s pridom uporabimo pri različnih aplikacijah elektrotransfekcije skupaj v sodelovanju s skupinami iz Slovenije in tujine.
		ANG	PI is based on accuired knowledge during previous project "Mechanisms of DNA delivery with electrogene transfer" and current project connected understanding of mechanisms with theoretical analysis of DNA mobility. Both project togehter connect exprimental work on standard in vitro models with experiments on ex vivo and 3D gel models and finally with 3D numerical models of gene electrotransfer of mucle tissue. This interdisciplinary approach and series of developed methodological skills enabled generation of new scientific knowledge and practical skills that can be now applied in different applications in collaborations with different groups froms Slovenia and abroad.
	Šifra	D.01 Vodenje/koordiniranje (mednarodnih in domačih) projektov	
	Objavljeno v	Elsevier;Academic Press; Advances in planar lipid bilayers and liposomes; 2012; Str. 77-104; A': 1; Avtorji / Authors: Kandušer Maša, Pavlin Mojca	
	Tipologija	1.16 Samostojni znanstveni sestavek ali poglavje v monografski publikaciji	
5.	COBISS ID	10780500	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Aktivacija proinflatatornega citokina IL-1 beta pri elektroporaciji
		ANG	Activation of proinflammatory cytokine IL-1 [beta] upon electroporation
	Opis	SLO	S sodelovanjem Laboratorija za biotehnologijo Kemijskega inštituta (vodja prof. Roman Jerala) smo analizirali vpliv elektroporacije na sprožitev imunskega odziva, trenutno pa je to še precej neraziskano področje. Testirali smo različne protokole električnih pulzov ter vpliv medijev na viabilnost in na sam imunski odziv preko aktivacije inflammasoma, proteinskega kompleksa prirojenega imunskega sistema, ki je zadolžen za sprožitev/aktivacijo vnetnih procesov preko aktivacije vnetnih citokinov. Aktivacijo inflammasoma, ki bi jo utegnili sprožiti različni pulzni protokoli smo opazovali na mišjih makrofagih, specifičnost signalne poti, ki vodi v aktivacijo, pa smo določali s pomočjo mišjih makrofagov z onesposobljenimi geni za določene komponente izbranih signalnih poti. Ugotovili smo aktivacijo imunskega sistema za pulzne protokole tipične za elektrotransfekcijo, ki pa ni bila specifična za aktivacijo inflammasoma. V nadaljevanju smo izvedli še poskuse za nano-električnimi pulzi, vendar smo

		tudi za te pulze dobili podoben rezultat. Rezulati pa so pomembni za uporabo elektroporacije in vivo (DAN vakcinacija, elektrotransfekcija, elektrokemoterapija), saj je pomembno razumeti potencialni imunski odziv.
	ANG	Electroporation is a frequently used method for increasing permeability of the cell membrane, but can also cause damage to the cell: cytosol leakage, ROS formation, osmotic swelling, necrosis and induction of apoptosis. Cell stress and cell damage can also trigger inflammasome activation. However potential immune system was not analysed in many papers of electroporation. In this paper we analysed whether electroporation of macrophages in vitro can trigger NLRP3 inflammasome activation and subsequent secretion of IL-1 β . Cells were exposed to electric pulses and quantity of secreted IL-1 β was determined. Our results show that the observed IL-1 β secretion was not NLRP3 inflammasome dependent but indicate that nevertheless, electroporation triggers a proinflammatory immune response through IL-1 β secretion.
Šifra	F.02	Pridobitev novih znanstvenih spoznanj
Objavljeno v	IEEE Region 8, Slovenska sekcija IEEE; Zbornik triindvajsete mednarodne Elektrotehniške in računalniške konference ERK 2014, 22. - 24. september 2014, Portorož, Slovenija; Zbornik ... Elektrotehniške in računalniške konference ERK ...; 2014; Zv. B; str. 119-122; Avtorji / Authors: Lojk Jasna, Hafner Bratkovič Iva, Jerala Roman, Pavlin Mojca	
Tipologija	1.08	Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci

8. Drugi pomembni rezultati projektne skupine^Z

1)

Razvili smo tudi metodologijo ki nam skupaj s sistemom za avtomatsko kvantifikacijo fluorescenčnih slik omogoča mnogo hitrejšo analizo večjega števila parametrov pri različnih analizah od učinkovitosti transfekcije do analize toksičnosti tretmaja.

Omenjeni program nam omogoča, da del poskusov izvajamo na pritrjenih celicah (običajno izvedeno na celicah v suspenziji), ki predstavljajo bolj relevanten sistem za prenos zaključkov v razmere v tkivih. Programski rešitvi sta prostodostopni na:

<http://lalg.fri.uni-lj.si/learn123/>

<http://lalg.fri.uni-lj.si/CellCounter/>

2)

PAVLIN, Mojca, KUMER, Ana Angela, KANDUŠER, Maša. Genska elektrotransfekcija : vplivajo električni pulzi tudi na celice, ki jim niso bile neposredno izpostavljene?. Elektrotehniški vestnik [COBISS.SI-ID 10517844]:

V nekaterih primerih je zelo pomembno, da transficirane celice preživijo in ohranijo svoje funkcije, zato smo se v našem prispevku osredinili na vpliv visokonapetostnih pulzov na preživetje celic, ki pulzom niso bile neposredno izpostavljene. Uporabili smo celično linijo CHO v razmerah in vitro in izvedli poskuse na pritrjenih in na celicah v suspenziji. Naši rezultati kažejo, da umirajoče ireverzibilno elektroporirane celice ne zmanjšajo preživetja celic, ki niso bile neposredno izpostavljene električnim pulzom.

3) MARJANOVIČ, Igor, KANDUŠER, Maša, MIKLAVČIČ, Damijan, MANČEK KEBER, Mateja, PAVLIN, Mojca. Comparison of flow cytometry, fluorescence microscopy and spectrofluorometry for analysis of gene electrotransfer efficiency. The journal of membrane biology [COBISS.SI-ID 10746708]

Izvedli smo široko metodolško analizo primerjave treh tehnik , ki se uporabljajo za kvantifikacijo genske elektrotransfekcije. Analiziramo prednosti in slabosti vsake tehnike ter potencialne nevarnosti pri primerjanju rezultatov pridobljenih z različnimi tehnikami.

9.Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine⁸

9.1.Pomen za razvoj znanosti²

SLO

Pridobljeno znanje in analiza mehanizmov vpletenih v ključne korake genske elektrotransfekcije skupaj s teoretičnim opisom procesov je dala nova spoznanja na področju genske elektrotransfekcije. To omogoča boljše razumevanje procesov ter posledično hitrejšo optimizacijo genske elektrotransfekcije za in vitro in ex vivo razmere.

Eksperimentalna in teoretična analiza sega od vizualizacije posamezne celice mioblasta, analize elektrotransfekcije ter znotrajceličnega transporta v mišičnih cevčicah, do optimizacije učinkovitosti elektrotransfekcije z uporabo 3D numeričnimi modeli tkiva skeletne mišice. Vzporedno smo zasnovali široko študijo vseh korakov elektrotransfekcije na CHO celicah. V zadnjih letih so bile identificirane različne siRNA in miRNA kot zelo obetavne tarče za uravnavanje izražanja genov ter zdravljenje različnih bolezni. Uspešno smo optimizirali vnos siRNK kot testno molekulo za optimizacijo in vitro pogojev elektrotransfekcije za kratke oligonukleotide na primarnih humanih mioblastih – vzporedno pa smo analizirali tudi relevantne mehanizme ter izvedli primerjavo s procesi pri elektrotransfekciji pDNA.

Nadalje smo razvili smo prvi "multiscale model" elektrotransfekcije tkiva – kjer smo dinamično rešitev za vsiljeno transmembransko napetost in permabilizacije na posamezni celici preko 3D numeričnega modela sklopili s sistemov več celic, tako da lahko opazujemo učinkovite lastnosti – kot je učinkovita prevodnost, delež permabiliziranih celic in časovna dinamika na bolj realnem »tkivnem« modelu.

Vzporedno smo nadgradili obstoječi 3D numerični model, ki omogoča analizo in optimizacijo položaja elektroda ter vizualizacijo porazdelitve električnega polja in toka v skeletni mišici . Poleg znanstvenih spoznanj so tudi pridobljene metodološke veščine (zasnova elektrode, primerjava različnih metod kvantifikacije transfekcije, avtomatska analiza mikroskopskih slik) zanimive širše za znanstvenike, ki uporabljajo tehnike transfekcije na širokem področju biotehnologije in biomedicine.

Razumevanje procesov, ki so pomembni za uspešno gensko elektrotransfekcijo, so vodili k izboljšavi obstoječih protokolov in s tem učinkovitosti genske elektrotransfekcije kar lahko pripomore k hitrejšemu razvoju in uporabi brezvirusne elektrogenske terapije v biomedicinskih aplikacijah. Pridobljeno eksperimentalno znanje na in vitro 3D gelskih modelih ter razviti teoretični modeli elektromobilnosti DNA pripomore k razumevanju mehanizmov ter optimizaciji protokolov v razmerah podobnih v tkivu.

Uporaba naprednih numeričnih modelov za optimizacijo električnih parametrov in konfiguracij elektrode ter analiza segrevanja lahko pripomore k nadaljnemu napredku na področju genske elektrotransfekcije in vivo. Specifično lahko razviti modeli v sodelovanju s skupinami, ki izvajajo in vivo ter klinične raziskave omogoča izboljšave učinkovitosti genskega vnosa v mišično tkivo ter potencialno k zmanjšanju števila žrtvovanih živali pri določanju optimalnih parametrov. Rezultati so lahko pomembni za raziskovalce, ki se ukvarjajo z elektrogensko terapijo in elektrogensko vakcinacijo v predkliničnih raziskavah.

ANG

Our experimental observation of different key steps of gene electrotransfer together with theoretical description of the processes gave new insights into relevant mechanisms. This is important for faster optimisation of the protocols for transfection of cell suspensions, attached cells from primary to cancer cells.

The experimental results and theoretical analysis developed during the project range from single cells visualization experiments to broad analysis of electrotransfer efficiency in primary human myoblasts, myotubes, to optimization of electrotransfection efficiency in 3D numerical models of skeletal muscle tissue. In parallel a comprehensive study was done on CHO cells to systematically analyse all relevant steps of electrotransfection.

In the last decades several different siRNA and miRNA molecules were identified as very promising targets for regulation of gene expression and treatment of different diseases. We have successfully optimised protocols for transfer of siRNA in primary human myoblasts – in parallel the study analysed the relevant mechanisms and potential differences between siRNA and pDNA delivery.

We have also developed a first multiscale three-dimensional model of tissue electroporation where a dynamic single-cell solution is coupled with a multicellular 3D model. We investigated the temporal evolution of the electric conductivity of such cell system during application of an applied electric field. In parallel we have further developed 3D model that enables analysis and optimisation of electrodes and electric field distribution in skeletal muscle coupled with thermal effects. In parallel some practical methodological solutions (electrodes design, comparison of different quantification techniques, automatic cell counting of microscopical images) can be used by other researchers that use transfection techniques in the broad field of biotechnology and biomedicine.

Understanding the process involved in successful and long-lived gene electrotransfer will lead to faster development and application of gene therapy without viral vectors, and to improvement of existing protocols, thus increasing efficiency of gene electrotransfer. Furthermore, developed in vitro 3D gels together with theoretical models of DNA electromobility can aid to understanding of the processes and to faster optimisation of protocols in vivo. Use of advanced 3D numerical modeling for optimization of electric parameters and electrode configuration together with analysis of thermal effects can be used for further improvement of protocols for delivery in muscle tissue, and hopefully to reduce number of sacrificed animals. The results are expected to be used by other researchers in fields of biotechnological and biomedical applications of EGT in in vivo and preclinical studies.

9.2. Pomen za razvoj Slovenije¹⁰

SLO

Vodja projekta je tekom projekta vzpostavila široke povezave z več raziskovalnimi skupinami v Sloveniji s kompletno ekspertizo: Laboratorij za biotehnologijo KI, Inštitutom za biologijo celice MF-UL, Laboratorijem za molekularno biologijo MF-UL ter z Odsekom za biotehnologijo IJS. To omogoča učinkovit prenos metodološkega znanja in ekspertiz med skupinami v Sloveniji.

Projekt je omogočil prenos novih tehnologij na področju biotehnologije in medicine v slovensko okolje.

PI in člani skupine so vodili razvoj tehnik (protokoli vnosa, elektrode, visoko-napetostni generator) ter njihovo implementacijo pri aplikacijah genske elektrotransfekcije za vnos DNA in kratkoveržni RNA molekule, kar omogoča vnos in utišanje genov in vitro (normalne celice, rakaste celice) ter v tkivnih rezinah ex vivo.

Prenos naprednih numeričnih metod v biomedicino: pridobljena eksperiza in široko poznavanje metod numeričnega modeliranja, je pripomoglo k prenosu teh znanj tudi na področje EGT za gensko terapijo. Na osnovi 3D numeričnih modelov za EGT smo vzpostavili sodelovanje z vodilnim centrom v Evropi za translacijo elektrogenske terapije v kliniko za zdravljenje raka (Department of experimental Oncology Herlev Hospital, Copenhagen).

Možnost širšega povezovanja s partnerji znotraj EU pri implementaciji elektrogenske transfekcije v biotehnoških in biomedicinskih aplikacijah kot sta elektrogenska terapijo in DNA vakcinacija – vključitev v prijavno vlogo BIOENCA COST konzorcija, ki povezuje skupine iz področja nevrodegenerativnih bolezni, biomedicine in matičnih celic.

Povezava visokotehnološkega znanja z izobraževalnim sistemom je bila izvedena preko dodiplomskih in podiplomskih predmetov na področju biomedicine ter vključitvijo več mlajših raziskovalcev projekt. PI ter vodji sodelujočih skupin imajo izkušnje z delom v interdisciplinarnih skupinah in so bili mentorji več diplomskih in doktorskim študentom na različnih področjih od elektrotehnike do biokemije medicine. Vključenost več diplomskih ter doktorskih študentov ter podoktorskih raziskovalcev v projekt je omogočila neposreden stik z vrhunskimi biotehnoškimi in biomedicinskimi metodami. Usposabljanje diplomskih in

doktorskih študentov za delo na vrhunski tehnologiji ter tesni stiki PI z več skupinami in industrijo so omogočili tudi možnost neposrednega prenosa znanja v industrijo na področju razvoja in aplikacij numeričnega modeliranja, ter razvoja in uporabe novih metod in tehnologij. PI je na začetku projekta ustanovila interdisciplinarno skupino, ki je trenutno sestavljena iz raziskovalcev iz področij fizike, biologije, biotehnologije in biokemije. Predlagani projekt je omogočil konsolidacijo mlade raziskovalne skupine . V izobraževanje mlajših raziskovalcev je vključeno tudi obiskovanje vrhunskih laboratorijev v svetu, kar je pomembno za dostopanje do tujih znanj obenem pa tudi osnova za izvedbo visoko kvalitetnih raziskav v Sloveniji.

Varovanje zdravja: uspešno smo razvili protokol za učinkovit vnos plazmidne DNA v eksplante mišjih hrbtenjač v sodelovanju z dr. Borisom Rogljem, znan.svet iz IJS, ki je tudi vodja projekta "Patogeni mehanizem podaljšanih heksanukleotidnih ponovitev v genu C9orf72 pri nevrodegeneraciji". Projekt je povezan z amiotrofična lateralno sklerozo (ALS) in frontotemporalno lobarno degeneracijo (FTLD), obe pa predstavljata dve kompleksni in neozdravljivi nevrodegenerativni bolezni. Projekt je zastavljen okoli vprašanja, kaj povzroča agregacijo normalnega TDP-43 pri ALS in FTLD, ter kakšna je vloga okvarjenega RNA metabolizma pri teh boleznih

ANG

PI has during the project established strong collaboration with several Slovenian groups with complementary expertise: Laboratory for biotechnology - KI, Institute of cell biology MF-UL, Laboratory for molecular neurobiology MF-UL nad with Department of biotechnology IJS. This enables efficient transfer of methodological knowledge and expertise between different research groups.

Transfer of new technologies and methods in fields of biotechnology and biomedicine in research institutions in Slovenia and facilitating transfer of these new technologies in applications.

PI and team members lead development of scientific techniques (protocols, electrodes, high-voltage generator) needed for efficient electrotransfer of DNA and short RNA molecules for gene delivery and silencing in cells (normal, cancer) and in ex vivo tissue samples and their translation into applications.

Implementation of advanced numerical methods - group has extensive expertise in 3D numerical modeling which is being implemented in field of gene electrotherapy (EGT). Based on developed 3D numerical models of EGT we have established collaboration with the leading research medical center (head. Prof. Julie Gehl, Department of experimental Oncology, Herlev Hospital, Copenhagen) in Europe for translation and application of electrogene transfer for cancer therapy.

Connections between Slovenian research institutions and partners from abroad that opens possibility of participation in EU projects in fields of gene electrotransfer and vaccination. Based on acquired knowledge we were invited in participation in COST consortium application BIOENECA that connect groups working in fields of neurodegenerative diseases, biomedicine and stem cells.

Connection of state-of-the-art knowledge with educational system was performed through undergraduate and graduate student courses in the field of biomedical engineering and biotechnology and with involvement of several younger researchers in the project. PI and heads of collaborating groups have extensive expertise in interdisciplinary teams and were mentors of several graduate and doctoral students in different fields from biology, biochemistry to medicine. Involvement of graduate students, young researchers and postdoctoral researchers in the project enabled them hands-on approach in high-tech biophysical and biomedical methods, and also possibility of direct knowledge transfer into industry through development of s-o-a-t numerical modeling. Close collaboration of PI with industry will further enable transfer of knowledge of methods/procedures (e.g. solutions for optimization with numerical modeling) into industry.

At the start of the project PI established a new young group which consisting from graduate

and doctoral students in different fields from physics to biology and biochemistry, and the proposed project enabled consolidation and obtaining critical mass of researchers needed for interdisciplinary approach. Training of our younger researchers included visits of top laboratories in Europe, which is important for further development of high quality research in Slovenia.

Health care: Currently we developed successfully protocol for electrotransfer of plasmid DNA into explants of mice spinal cord tissue in collaboration with prof. Boris Rogelj who is a PI of a project "Pathogenic mechanism of the C9orf72 expanded hexanucleotide repeat mutation in neurodegeneration" related with Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and frontotemporal lobar degeneration (FTLD), both being devastating neurodegenerative diseases that form two ends of a complex disease spectrum. This project analyses what makes 'normal' TDP-43 aggregate in ALS and FTLD and what is the role of perturbed RNA metabolism in these diseases.

10. Samo za aplikativne projekte in podoktorske projekte iz gospodarstva!

Označite, katerega od navedenih ciljev ste si zastavili pri projektu, katere konkretne rezultate ste dosegli in v kakšni meri so doseženi rezultati uporabljeni

Cilj		
F.01	Pridobitev novih praktičnih znanj, informacij in veščin	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.02	Pridobitev novih znanstvenih spoznanj	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.03	Večja usposobljenost raziskovalno-razvojnega osebja	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.04	Dvig tehnološke ravni	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.05	Sposobnost za začetek novega tehnološkega razvoja	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.06	Razvoj novega izdelka	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.07	Izboljšanje obstoječega izdelka	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE

	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.08	Razvoj in izdelava prototipa	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.09	Razvoj novega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.10	Izboljšanje obstoječega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.11	Razvoj nove storitve	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.12	Izboljšanje obstoječe storitve	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.13	Razvoj novih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.14	Izboljšanje obstoječih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.15	Razvoj novega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.16	Izboljšanje obstoječega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>

	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.17	Prenos obstoječih tehnologij, znanj, metod in postopkov v prakso	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.18	Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi, konference)	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.19	Znanje, ki vodi k ustanovitvi novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.20	Ustanovitev novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.21	Razvoj novih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.22	Izboljšanje obstoječih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.23	Razvoj novih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.24	Izboljšanje obstoječih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.25	Razvoj novih organizacijskih in upravljaljskih rešitev	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>

F.26	Izboljšanje obstoječih organizacijskih in upravljavskih rešitev	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.27	Prispevek k ohranjanju/varovanje naravne in kulturne dediščine	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.28	Priprava/organizacija razstave	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.29	Prispevek k razvoju nacionalne kulturne identitete	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.30	Strokovna ocena stanja	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.31	Razvoj standardov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.32	Mednarodni patent	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.33	Patent v Sloveniji	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.34	Svetovalna dejavnost	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.35	Drugo	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE

Rezultat	<input type="text"/>
Uporaba rezultatov	<input type="text"/>

Komentar

11. Samo za aplikativne projekte in podoktorske projekte iz gospodarstva!
Označite potencialne vplive oziroma učinke vaših rezultatov na navedena področja

	Vpliv	Ni vpliva	Majhen vpliv	Srednji vpliv	Velik vpliv	
G.01	Razvoj visokošolskega izobraževanja					
G.01.01.	Razvoj dodiplomskega izobraževanja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.01.02.	Razvoj podiplomskega izobraževanja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.01.03.	Drugo: <input type="text"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02	Gospodarski razvoj					
G.02.01	Razširitev ponudbe novih izdelkov/storitev na trgu	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.02.	Širitev obstoječih trgov	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.03.	Znižanje stroškov proizvodnje	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.04.	Zmanjšanje porabe materialov in energije	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.05.	Razširitev področja dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.06.	Večja konkurenčna sposobnost	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.07.	Večji delež izvoza	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.08.	Povečanje dobička	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.09.	Nova delovna mesta	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.10.	Dvig izobrazbene strukture zaposlenih	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.11.	Nov investicijski zagon	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.12.	Drugo: <input type="text"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03	Tehnološki razvoj					
G.03.01.	Tehnološka razširitev/posodobitev dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03.02.	Tehnološko prestrukturiranje dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03.03.	Uvajanje novih tehnologij	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03.04.	Drugo: <input type="text"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04	Družbeni razvoj					
G.04.01	Dvig kvalitete življenja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.02.	Izboljšanje vodenja in upravljanja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.03.	Izboljšanje delovanja administracije in javne uprave	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.04.	Razvoj socialnih dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.05.	Razvoj civilne družbe	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	

G.04.06.	Drugo:		<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.05.	Ohranjanje in razvoj nacionalne naravne in kulturne dediščine in identitete		<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.06.	Varovanje okolja in trajnostni razvoj		<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.07	Razvoj družbene infrastrukture						
G.07.01.	Informacijsko-komunikacijska infrastruktura		<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.07.02.	Prometna infrastruktura		<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.07.03.	Energetska infrastruktura		<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.07.04.	Drugo:		<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.08.	Varovanje zdravja in razvoj zdravstvenega varstva		<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.09.	Drugo:		<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	

Komentar

--

12.Pomen raziskovanja za sofinancerje¹¹

	Sofinancer		
1.	Naziv		
	Naslov		
	Vrednost sofinanciranja za celotno obdobje trajanja projekta je znašala:		EUR
	Odstotek od utemeljenih stroškov projekta:		%
	Najpomembnejši rezultati raziskovanja za sofinancerja		Šifra
	1.		
	2.		
	3.		
	4.		
	5.		
	Komentar		
	Ocena		

13.Izjemni dosežek v letu 2014¹²**13.1. Izjemni znanstveni dosežek**

Naslov: Novi vpogledi v mehanizme genske elektrotransfekcije

PAVLIN, Mojca, KANDUŠER, Maša. New insights into the mechanisms of gene electrotransfer - experimental and theoretical analysis. Scientific reports, doi: 10.1038/srep09132. [COBISS.SI-ID 10952788].

kategorija: 1A1 (Z, A", A', A1/2);

Članek se osredotoča na analizo mehanizmov vnosa genov z metodo elektroporacije (gensko elektrotransfekcijo), ki se je v zadnjih letih izkazala za učinkovito metodo vnosa plazmidne DNA; oligonukleotidov in kratkih RNA molekul v celice in tkiva. Predstavili smo nove eksperimentalne in teoretične rezultate analize različnih korakov vpletenih v proces elektrotransfekcije z široko in vitro študijo na pritrjenih celic in celičnih suspenzij podkrepnjeno s teoretično analizo relevantnih procesov. Razumevanje razmerij med permeabilizacijo, elektroforezo, viabilnostjo in učinkovitostjo transfekcije lahko pomaga pri hitrejši optimizaciji protokolov električnih pulzov za specifične aplikacije.

13.2. Izjemni družbeno-ekonomski dosežek

C. IZJAVE

Podpisani izjavljam/o, da:

- so vsi podatki, ki jih navajamo v poročilu, resnični in točni
- se strinjamo z obdelavo podatkov v skladu z zakonodajo o varstvu osebnih podatkov za potrebe ocenjevanja ter obdelavo teh podatkov za evidence ARRS
- so vsi podatki v obrazcu v elektronski obliki identični podatkom v obrazcu v pisni obliki
- so z vsebino zaključnega poročila seznanjeni in se strinjajo vsi soizvajalci projekta

Podpisi:

*zastopnik oz. pooblaščen oseba
raziskovalne organizacije:*

in

vodja raziskovalnega projekta:

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za
elektrotehniko

Mojca Pavlin

ŽIG

Kraj in datum:

Ljubljana

13.3.2015

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2015/165

¹ Napišite povzetek raziskovalnega projekta (največ 3.000 znakov v slovenskem in angleškem jeziku) [Nazaj](#)

² Napišite kratko vsebinsko poročilo, kjer boste predstavili raziskovalno hipotezo in opis raziskovanja. Navedite ključne ugotovitve, znanstvena spoznanja, rezultate in učinke raziskovalnega projekta in njihovo uporabo ter sodelovanje s tujimi partnerji. Največ 12.000 znakov vključno s presledki (približno dve strani, velikost pisave 11). [Nazaj](#)

³ Realizacija raziskovalne hipoteze. Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikost pisave 11) [Nazaj](#)

⁴ V primeru bistvenih odstopanj in sprememb od predvidenega programa raziskovalnega projekta, kot je bil zapisan v predlogu raziskovalnega projekta oziroma v primeru sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine v zadnjem letu izvajanja projekta, napišite obrazložitev. V primeru, da sprememb ni bilo, to navedite. Največ 6.000 znakov vključno s presledki (približno ena stran, velikost pisave 11). [Nazaj](#)

⁵ Navedite znanstvene dosežke, ki so nastali v okviru tega projekta. Raziskovalni dosežek iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A" ali A'. [Nazaj](#)

⁶ Navedite družbeno-ekonomske dosežke, ki so nastali v okviru tega projekta. Družbeno-ekonomski rezultat iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A" ali

A'.

Družbeno-ekonomski dosežek je po svoji strukturi drugačen kot znanstveni dosežek. Povzetek znanstvenega dosežka je praviloma povzetek bibliografske enote (članka, knjige), v kateri je dosežek objavljen.

Povzetek družbeno-ekonomskega dosežka praviloma ni povzetek bibliografske enote, ki ta dosežek dokumentira, ker je dosežek sklop več rezultatov raziskovanja, ki je lahko dokumentiran v različnih bibliografskih enotah. COBISS ID zato ni enoznačen, izjemoma pa ga lahko tudi ni (npr. prehod mlajših sodelavcev v gospodarstvo na pomembnih raziskovalnih nalogah, ali ustanovitev podjetja kot rezultat projekta ... - v obeh primerih ni COBISS ID). [Nazaj](#)

⁷ Navedite rezultate raziskovalnega projekta iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) v primeru, da katerega od rezultatov ni mogoče navesti v točkah 6 in 7 (npr. ni voden v sistemu COBISS). Največ 2.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

⁸ Pomen raziskovalnih rezultatov za razvoj znanosti in za razvoj Slovenije bo objavljen na spletni strani: <http://sicris.izum.si/> za posamezen projekt, ki je predmet poročanja [Nazaj](#)

⁹ Največ 4.000 znakov, vključno s presledki [Nazaj](#)

¹⁰ Največ 4.000 znakov, vključno s presledki [Nazaj](#)

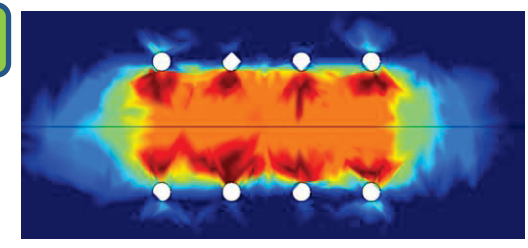
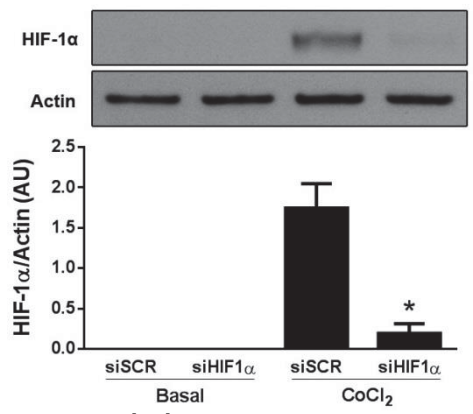
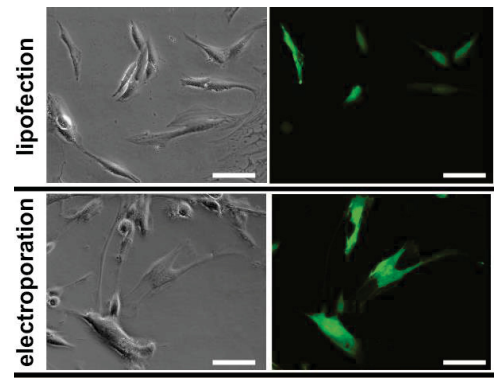
¹¹ Rubrike izpolnite / prepišite skladno z obrazcem "izjava sofinancerja" <http://www.arrs.gov.si/sl/progproj/rproj/gradivo/>, ki ga mora izpolniti sofinancer. Podpisan obrazec "Izjava sofinancerja" pridobi in hrani nosilna raziskovalna organizacija – izvajalka projekta. [Nazaj](#)

¹² Navedite en izjemni znanstveni dosežek in/ali en izjemni družbeno-ekonomski dosežek raziskovalnega projekta v letu 2014 (največ 1000 znakov, vključno s presledki). Za dosežek pripravite diapozitiv, ki vsebuje sliko ali drugo slikovno gradivo v zvezi z izjemnim dosežkom (velikost pisave najmanj 16, približno pol strani) in opis izjemnega dosežka (velikost pisave 12, približno pol strani). Diapozitiv/-a priložite kot priponko/-i k temu poročilu. Vzorec diapozitiva je objavljen na spletni strani ARRS <http://www.arrs.gov.si/sl/gradivo/>, predstavitev dosežkov za pretekla leta pa so objavljena na spletni strani <http://www.arrs.gov.si/sl/analize/dosez/>. [Nazaj](#)

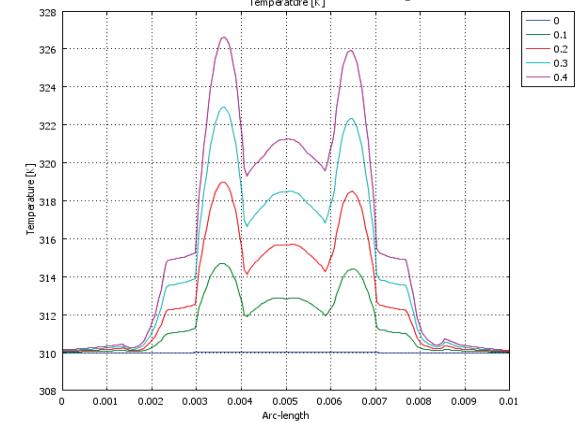
Obrazec: ARRS-RPROJ-ZP/2015 v1.00a
95-40-7D-A8-FD-14-41-35-62-E5-EC-43-D8-18-FD-C6-A0-5D-D7-AD

Priloga 1

Optimisation of protocols for pDNA and siRNA delivery into myoblasts



Conductivity (up) and temperature between electrodes (down)

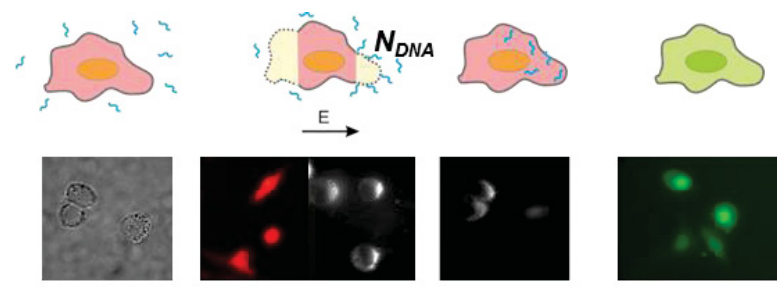
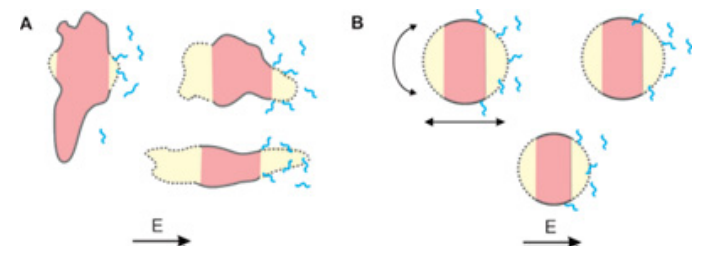
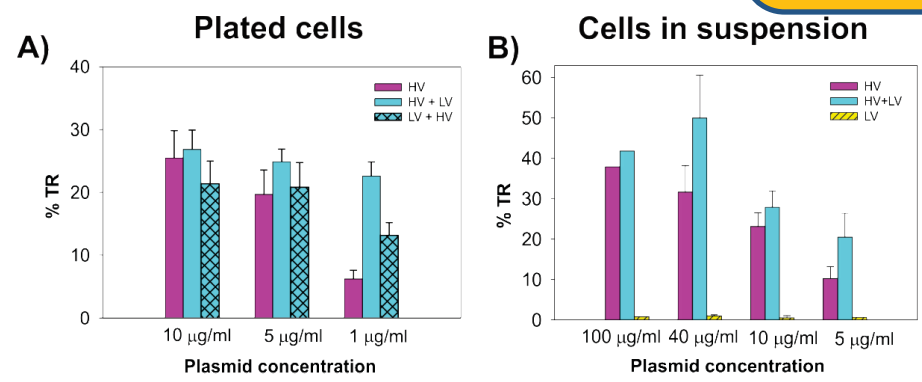


Delivery of pEGFP and siRNA – HIF-1alpha

Analysis of mechanisms
visualization, quantification, theoretical analysis

New insights into the mechanisms of electrotransfer

Development of 3D numerical models of muscle electrotransfer

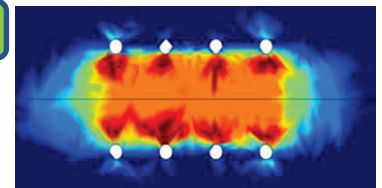
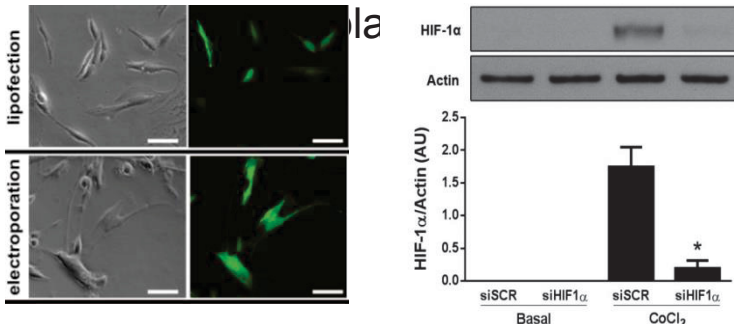


BF PI TOTO RHODAMIN GFP
Steps of electrotransfer: permeabilisation, interaction, transfer and expression

Priloga 2

mechanisms of gene electrotransfer - experimental and theoretical analysis. Scientific reports, 2015, 5, str. 1-11, [COBISS.SI-ID 10952788]1A1 (Z, A'', A', A1/2); uvrstitev: SCI
 Opis dosežka: Članek se osredotoča na analizo mehanizmov vnosa genov z metodo elektroporacije (gensko elektrotransfekcijo), ki se je v zadnjih letih izkazala za učinkovito metodo vnosa plazmidne DNA; oligonukleotidov in kratkih RNA molekul v celice in tkiva. Predstavili smo nove eksperimentalne in teoretične rezultate analize različnih korakov vpletenih v proces elektrotransfekcije z široko in vitro študijo na pritrjenih celic in celičnih suspenzij podkrepljeno s teoretično analizo relevantnih procesov. Razumevanje razmerij med permeabilizacijo, elektroforezo, viabilnostjo in učinkovitostjo transfekcije lahko pomaga pri hitrejši optimizaciji protokolov električnih pulzov za specifične aplikacije.

Optimisation of protocols for pDNA and siRNA

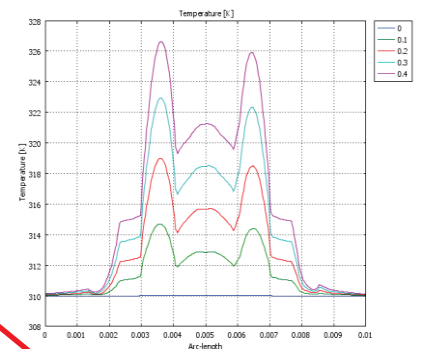
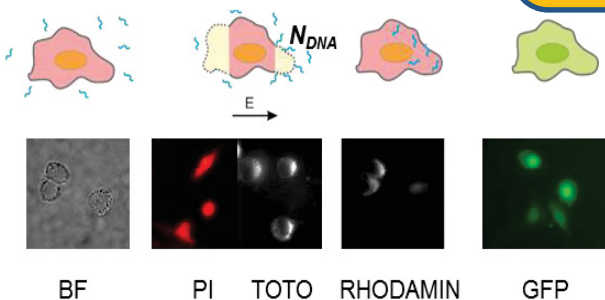


Conductivity (up) and temperature between electrodes (down)

Delivery of pEGFP and siRNA – HIF-1alpha

Analysis of mechanisms

New insights into the mechanisms of electrotransfer



Development of 3D numerical models

Steps of electrotransfer: permeabilisation, interaction, transfer and expression